

TLR1 – 10 aktiivisuuden korrelaatio suun lichen planusta ja suusyöpää sairastavilla.

Sami Keränen HLK

Helsinki

Syventävä tutkielma

Ohjaaja: Johanna Uittamo HLT, LL

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen Tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Hammaslääketiede
Tekijä – Författare – Author Sami Keränen		
Työn nimi – Arbetets title – Title TLR 1-10 reseptorien vaikutus OLP:n malignisoitumiseen		
Oppiaine – Läroämne – Subject Hammaslääketiede		
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävä tutkielma	Aika – Datum – Month and year 3/2021	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 27
Tiivistelmä – Referat – Abstract Synnynnäistä immuunipuolustusta muodostavat elimistön fyysiset esteet kuten iho, hengitystiet ja ruuansulatuskanava, sekä ensilinjan immuunipuolustuksen epäspesifiset solut, kuten monosyytit/makrofagit, neutrofiilit, basofiilit, eosinofiilit ja NK-solut (Natural killer cells). Synnynnäisen immuunipuolustuksen leukosyytit tunnistavat normaalissa toiminnassa elimistön ulkopuoliset kohteet toll-like reseptoreillaan, ja esimerkiksi NK-solut tunnistavat elimistön omia soluja, jotka ovat viruksen infektoimia tai tuumorigeenisia. Eri kudosten soluilla on sisäisiä mekanismeja, jotka yleensä vievät väärin toimivan solun apoptoosiin esimerkiksi p53-geenin aktivoimana. Sisäiset säätelymekanismiit voivat pettää mutaatioiden aiheuttamien geneettisten muutosten vuoksi johtaen pahimmillaan syöpään. Suun limakalvoilla esiintyvä punajäkälä eli oral lichen planus (OLP) on inflammatorinen, verrattaen yleinen immunoreaktiivinen sairaus. OLP on alatyyppe Lichen planukselle, joka voi ilmetä tyypillisesti ranteiden ja nilkkojen seudun iholla tai kaikilla elimistön limakalvoilla, kuten nielussa, ruokatorvessa, korvissa tai sukuelimissä. OLP voi olla osin ulseratiivista, erosiivista tai koostua punertavista atrofisista alueista. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kuvailla TLR-reseptoreiden aktivoitumista sairauden eri vaiheissa. Tätä tietoa voidaan hyödyntää tulevaisuudessa lääkehoidon kehittämiseen ja autoimmuunisairauden muodostumisen, sekä malignisoitumisen mekanismien selvittämiseen. Tutkimukseen on kerätty kudoksenäytteet potilaista, jotka ovat käyneet Suu- ja leukasairauksien osastolla Helsingin yliopistollisessa sairaalassa, ja Helsingin Yliopistollisessa hammasklinikassa vuosina 2007 – 2011. Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin $p < 0,05$ Tutkimustulosten perusteella useilla TLR-reseptoreilla oli kohonneet aktiivisuustasot premalignissa koeryhmässä. TLR 6 ja 10 -aktiivisuudet olivat ryhmässä suurimmat syöpäpotilaiden koeryhmässä, ja TLR4 oli ainoa reseptori, joka oli aktiivisin premalignissa koeryhmässä. TLR2 ei ollut aktiivinen minkään kudoksenleikkien endoteelikerroksessa ja syytä sen inaktiivisuudelle tulisi tutkia lisää. TLR10 on vielä varsin hiljattain löydetty reseptori, jonka toimintaa on vielä syytä tutkia syöpäsairauksissa.		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Toll-like reseptorit, Suusyöpä, Oral lichen planus		
Säilytyspaikka – förvaringställe – Where deposited		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		

Sisällysluettelo

1 Johdanto	1
1.1 Synnynnäinen immuunipuolustus	1
1.2 Toll-like-reseptorit	3
1.3 Lichen Planus	5
1.4 Suusyöpä	8
2 Tavoitteet	9
3 Materiaali ja menetelmät	10
4 Tulokset	12
5 Johtopäätökset	19
6 Pohdinta	21
7 Lähteet	23
 Kuva 1	 13
Kuva 2	14
Kuva 3	14
Kuva 4	15
Kuva 5	15
Kuva 6	16
Kuva 7	16
Kuva 8	17
Kuva 9	17
Kuva 10	18
Kuva 11	18

1 Johdanto

1.1 Synnynnäinen immuunipuolustus

Elimistön ulkopuolisia taudinaiheuttajia vastaan on evoluution aikana muodostunut synnynnäinen immuunipuolustus. Synnynnäistä immuunipuolustusta muodostavat elimistön fyysiset esteet kuten iho, hengitystiet ja ruuansulatuskanava, sekä ensilinjan immuunipuolustuksen epäspesifiset solut, kuten monosyytit/makrofagit, neutrofiilit, basofiilit, eosinofiilit ja NK-solut (Natural killer cells). Synnynnäisen immuunipuolustuksen leukosyytit tunnistavat normaalissa toiminnassa elimistön ulkopuoliset kohteet toll-like reseptoreillaan, ja esimerkiksi NK-solut tunnistavat elimistön omia soluja, jotka ovat viruksen infektoimia. NK-solut myös poistavat muuttuneita suurentuneen riskin tuumorigeenisiä soluja. Makrofagit toimivat kudoksissa sekä fagosytoivina soluina, että linkkinä synnynnäisen ja adaptiivisen immuunipuolustuksen kanssa yhdessä dendriittisolujen kanssa. Molemmat synnynnäisen immuunipuolustuksen solut esittelevät CD4+ T-soluille (CD, cluster of differentiation), MHCII (major histocompatibility complex) -reseptoreillaan fagosytoimiensa taudinaiheuttajien antigeeneja.

Makrofagit myös rekrytoivat polymorfonukleaarisia (PMN) fagosyyttejä inflammaatioalueelle sytokiineja erittämällä. Sytokiinit, joihin kuuluu esimerkiksi TNF (tuumorinekroositekijä), erilaisia interleukiineja (IL) ja proteiini CD40L voimistavat adaptiivisen immuunipuolustuksen aktivaatiota, ja paikalle saapuvat edellä mainitut PMN-solut, joihin kuuluvat muun muassa eosinofiilit, basofiilit sekä ennen kaikkea neutrofiilit ehkäisemään infektion leviämistä (1, 2).

Eri kudosten soluilla on sisäisiä mekanismeja, jotka yleensä vievät väärin toimivan solun apoptoosiin esimerkiksi p53-geenin aktivoimana. Sisäiset säätelymekanismit voivat pettää mutaatioiden aiheuttamien geneettisten muutosten vuoksi. Synnynnäisen immuunipuolustuksen mekanismeihin kuuluu edellä mainitut NK-solut, jotka tunnistavat muuttuneiden solujen pinnalla sijaitsevat tuumorispesifiset antigeenit (TSA). Antigeenien havaitsemisen jälkeen immuunipuolustuksen solut kykenevät viemään kohdesolun apoptoosiin mitokondriaalista reaktiokaskadia pitkin. Tilannetta, jossa syöpäsolu kehittää omat mekanisminsa välttääkseen immuunipuolustuksen kutsutaan usein seitsemänneksi kohdaksi Hallmarks of cancerissa (3, 4).

1.2 Toll-like-reseptorit

Synnynnäiseen immuunipuolustukseen kuuluvat Toll-like-reseptorit (TLR), jotka ovat integraalisia kerran solukalvon läpäiseviä proteiineja jotka toimivat hahmontunnistusreseptoreina (5). Toll-like-reseptoreiden intrasellulaarinen osuus muistuttaa interleukiini-1 perheen reseptoreita ja tätä kutsutaan Toll/IL-1 reseptoriksi (TIR). Toll-like-reseptorien ekstrasellulaarinen osuus koostuu leusiinipitoisista jaksoista (Leucine-rich repeats, LRR) (6). Erilaisia TLR tyyppin reseptoreita on löydetty 13, joista 10 on tunnistettu ihmisessä.

Immuunipuolustuksessa Toll-like-reseptorit reagoivat spesifisti molekyyleihin, jotka assosioituvat patogeeneihin tai kudostuhoon. Tästä käytetään nimitystä pathogen-associated molecular patterns (PAMP), tai vaihtoehtoisesti damage-associated molecular patterns (DAMP), jotka välittyvät kudostuhon aikana muina molekylaarisina yhdisteinä. PAMP/DAMP:in spesifisyys tiettyyn ligandiin riippuu TLR:n tyypistä. Esimerkiksi TLR4 tunnistaa Candida-lajikkeiden mannaania ja bakteerien lipopolysakkaridia (LPS), jota löytyy gramnegatiivisten bakteerien soluseinästä (7). TLR 5 tunnistaa mm. Bakteerien flagelliinia, ja sen on todettu Rutkowski et al. (8) tutkimuksessa vaikuttavan reseptorin melko yleisen polymorfismin kautta syöpäpotilaiden tulehdustilaan ja kliiniseen lopputulokseen. TLR 7, 8 ja 9 sen sijaan tunnistavat dsRNA:ta, ssRNA:ta ja DNA:n metyloimattomia CpG-jaksoja. Nämä liittyvät tyypillisimmin viraalisiin patogeeneihin, vaikka esimerkiksi TLR 9 kykeneekin tunnistamaan myös bakteeriperäistä DNA:ta. Erityisesti TLR 9 tunnistaa metyloimattomia CpG jaksoja (sytosiini – guaniini) DNA:sta (9). Ramirez-Ortiz et al. (10) on mainittu TLR 9 yhteydestä lupus erythematosuksen sekä muiden autoimmuunisairauksien ilmentymiseen.

Toll-like-reseptoreita sijaitsee sekä solua ympäröivällä kalvolla, että solulimassa vesikkeleissä. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 sijaitsevat solukalvon pinnalla. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 sijaitsevat endosomeissa (11). Kaikki Toll-like-reseptorit syntetisoidaan

solulimakalvostolla, josta ne lähetetään Golgin laitteen kautta kohteeseensa, eli solukalvolle tai vesikkeliin (12). Normaalissa TLR 1-10 toiminnassa PAMP/DAMP-tunnistuksen tapahtuessa välittää aktivoitunut reseptori signaalin, joka aktivoi fosforylaatiokaskadin, mikä puolestaan vapauttaa NFkB:n inhibitorisesta proteiinikompleksista, jolloin tämä voi siirtyä solun tumaan aktivoimaan synnynnäiseen immuunipuolustukseen liittyviä geenejä. TLR:t ylläpitävät homeostaasia mm. vuorovaikuttamalla elimistön mikrobiflooran kanssa (13). TLR 1-10 -reseptorit sijaitsevat mm. Makrofagien, neutrofiilien, mast-solujen, NK-solujen ja dendriittisten solujen solukalvoilla (12). Reseptorien aktiivisuuden on havaittu lisääntyneen erilaisissa tulehduksellisissa sairauksissa, kuten ateroskleroosissa ja lichen planuksessa (LP). TLR5:n immunoreaktiivisuus vaikuttaisi olevan kohonnut basaalikerroksen soluissa oral lichenoid disease (OLD) potilailla (14).

Näitä hahmontunnistusreseptoreita on löydetty myös endoteelisolujen solulimakalvoilta, jotka toimivat leukosyyttien tapaisesti solukerroksena verhoten muuta kudosta, osana elimistön synnynnäistä immuunipuolustusta. Endoteelisolukko kykenee siis osallistumaan patogeenisten bakteerien tai virusten infektoimien solujen tunnistamiseen, mutta myös tehostamaan paikallista tulehdusreaktiota reguloimalla angiotensiini II erittymistä, joka vuorostaan kontrolloi pienten verisuonien vasokonstriktiota vaikuttaen tulehdusvasteeseen verenvirtausta ohjaamalla. Vascular endothelial-derived growth factor (VEGF) vaikuttaa sekä de novo endoteelisolujen kehittymisen myötä uusien verisuonien muodostumiseen eli vasculogeneesiin, että angiogeneesiin (15, 16).

1.3 Lichen Planus

Lichen planus on saanut nimensä kreikan ja latinan kielistä, jossa leichen tarkoittaa puun jäkälää, ja planus tarkoittaa tasaista. Lichen planuksen oireet on ensimmäistä kertaa kuvattu 1869, jolloin on myös mainittu sen verrattain harvinaisesta taipumuksesta malignisoitua (17).

Suun limakalvoilla esiintyvä punajäkälä eli oral lichen planus (OLP) on inflammatorinen, verrattaen yleinen immunoreaktiivinen sairaus. OLP on alatyyppejä Lichen planukselle, joka voi ilmetä tyypillisesti ranteiden ja nilkkojen seudun iholla tai kaikilla elimistön limakalvoilla, kuten nielussa, ruokatorvessa, korvissa tai sukuelimissä. Suun limakalvoille muodostuu OLP:ssä klassisesti retikulaarisia vaaleita juosteita, joita kutsutaan myös Wickhamin strioiksi. OLP voi olla osin ulseratiivista, erosiivista tai koostua punertavista atrofisista alueista (18). Yleensä vaikeahoitoisimmat potilaat kärsivät sekamuotoisesta tautimuodosta, joka on useimmiten kivuliain tautimuoto. OLP koostuu sille tyypillisistä relapsi- ja remissiovaiheista, eli OLP voi olla pitkäänkin myös melko oireeton. Koska OLP:ta sairastavilla potilailla voi esiintyä myös esophaguksen alueella limakalvon lichenoideja oireita, tulisi nieluun tai ruokatorveen kohdistuvien oireiden ilmaantuessa endoskopian kynnystä laskea malignisoitumisriskin vuoksi (17, 19).

Suun limakalvoilla voi esiintyä OLP:n kanssa samankaltaisia punertavia tulehtuneen näköisiä muutoksia, jotka voivat aiheuttaa kliinikolle vaikeuksia diagnostiikassa. Nämä lichenoidit reaktiot, tai oral lichenoid lesions (OLL), pitävät sisällään eri tyyppisiä limakalvojen muutoksia. OLL voi ilmetä vierasmateriaalin limakalvokontaktin kautta hypersensitiivisyytenä. Tyypillisiä hypersensitiivisyyttä aiheuttavia vierasmateriaaleja ovat muun muassa hampaiden paikkausmateriaalina käytetty amalgaami, kulta tai erilaiset muovit. Lisäksi lichenoidereaktioita voivat saada aikaan erilaiset lääkkeet sekä kudossiirteet (graft versus host) reaktiot (5, 17, 18). Muitakin suun limakalvon lichenoidereaktioita aiheuttavia sairauksia on olemassa, ja näistä esimerkkinä on lupus erythematosus ja erythema multiforme (10).

OLP aiheuttaa suun limakalvoilla usein kipua, ja on sensitiivinen erilaisille vahvoille ruoka-aineille joihin kuuluu esimerkiksi tomaatti, chili ja sitrushedelmät. Lisäksi suunhoidon tuotteista esimerkiksi tietyt hammastahnat ja suuvedet voivat pahentaa oireita. Potilaat joilla on diagnosoitu OLP saavat oireiden mukaista lääkehoitoa: kortikosteroideja, kalsineuriiniestäjiä tai muita immuunisuppressiivisia lääkkeitä kuten takrolimuusia. Kortikosteroidit vähentävät paikallisesti käytettynä limakalvon inflammatorista tilaa, ja kalsineuriiniestäjät ilmeisesti vähentävät sairauden aiheuttamaa kipua (20).

Histologinen tutkimus on usein tarpeen OLP:n diagnostiikassa ja OLP:lle ominaisesti nähdään, miten sytotoksiset T-lymfosyytit saavat aikaan kroonisen tulehdustilan aiheuttamalla limakalvon basaalkerroksen epiteelisolujen apoptoosia. T-lymfosyytit asettuvat histologisesti tarkasteltuna vyömäisenä infiltraattina basaalkerroksen alapuolella (21).

OLP:een sairastuvat 30-60 vuotiaat, naiset useammin kuin miehet. Myös lapset voivat harvinaisissa tapauksissa sairastua OLP:een. Kokonaisuudessaan väestöstä noin 0,5-3% sairastaa OLP:ta (22, 23).

OLP ja OLL luokitellaan PMOD:ksi (Potentially malignant oral disorders), sillä sairauksilla on mahdollisuus malignisoitua suusyöväksi, jonka vuoksi potilaat kontrolloidaan loppuelämänsä ajan vuosittain epäilyttävien limakalvomuutosten varalta. Suusyöpäriskin on arvioitu olevan noin 1% sairastuneista, mutta todellista riskiä on haastava arvioida luotettavasti OLP:en ja OLL:n epäyhteneväisen diagnoosikriteereiden vuoksi. Ilmeisesti erosiivinen OLP on korkeimmassa riskissä malignisoitumiselle (24).

Koska Lichen planuksen syntymekanismit ovat epäselvät, eikä sen ympäristön aikaansaamia riskitekijöitä tunneta, ei sairauteen ole ennaltaehkäisevää tai parantavaa hoitoa. Tiedetään kuitenkin, että spontaania paranemista tapahtuu. OLP:ta sairastavilla löydetään muuta väestöä useammin *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, sekä Hepatiitti-C (HCV) (25). Tutkimusten mukaan voidaan myös osoittaa että HCV-positiivisilla potilailla on lievästi suurempi riski maligniin muutokseen. Lisäksi potilaat, jotka käyttävät alkoholia ja tupakkaa, ovat suuremmassa riskissä sairastua OSCC:hen (Oral Squamous Cell Carcinoma) (26). Kielessä sijaitseva OLP malignisoituu useammin kuin muualla (27).

1.4 Suusyöpä

Yleisin suun alueen syöpä on suun levyepiteelikarsinooma, eli OSCC (oral squamous cell carcinoma). Suun ja nielun syövät tilastoidaan yhdessä, ja ne ovat tällä hetkellä kuudenneksi yleisimmät syöpäsairaudet. OSCC ilmenee kaksi tai kolme kertaa useammin miehillä kuin naisilla, ja sairastuneista selviytyy 5-vuotisseurannassa 50% (28, 29).

Suusyövän suurimpiin riskitekijöihin kuuluvat tupakointi ja alkoholi. Riskin suuruuteen vaikuttaa suoraan verrannollisesti tupakoinnin ja juodun alkoholin määrä. Tupakoijilla on kolme kertaa suurempi riski sairastua OSCC:an muuhun väestöön verrattuna, ja enemmän kuin 4 vuotta sitten tupakoinnin lopettaneilla on 35% pienempi riski suusyöpään sairastumiseen kuin henkilöillä, jotka eivät ole lopettaneet tupakointia (28).

Riskiä lisäävät myös PMOD:it, joita on käsitelty aiemmin tässä tekstissä. HPV-infektion osuudesta OSCC:n riskin kasvuun kiistellään, ja tutkimustuloksia tästä on sekä puolesta että vastaan. HPV:n on todettu infektoivan basaalikerroksen soluja, ja gingivan alueella normaalitilanteessa basaalikerroksen soluihin kosketuspinta löytyy syventyneistä ientaskuista (30).

Suusyövän hyvään hoitoennusteeseen liittyy erittäin vahvasti varhainen havaitseminen, ja potilaan ohjaaminen erikoissairaanhoidon yksikköön. Epäilyttävien limakalvomuutosten havaitseminen on pääosin suun terveydenhuollon ammattilaisten vastuulla. Limakalvon muutosten (kuten OLP) kontrollointi ja dokumentointi on tärkeää mahdollisen malignisoitumisen kannalta.

Alkuvaiheen tuumorien (T1 ja T2) diagnostiikan haasteena voi olla imusolmukkeiden peittyneet metastaasit, jotka voivat jäädä kliinisen tutkimuksen aikana huomaamatta, nostaten kyseisen potilasryhmän mortaliteettia tilastoissa. Vaiheen I ja II suusyövän hoitosuosituksena on tuumorin kirurginen eksiisio joko elektiivisen kaulan dissektion kanssa tai ilman. Tuumorien sijainti suuontelossa, sekä aiemmin hoidetut maligniteetit vaikuttavat hoitoennusteeseen. Ennustetta muuttaa myös aiemman hoidon yhteydessä käytetty sädehoito (31-33).

2 Tavoitteet

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää endoteelikerroksen hahmontunnistusreseptoreiden ilmentymisen yhteys OLP:tä ja syöpää sairastavilla potilailla.

Tutkimuksen avulla voidaan löytää juurisyitä TLR-reseptoreiden aktivoitumiselle sairauden eri vaiheissa. Tätä tietoa voidaan hyödyntää tulevaisuudessa lääkehoidon kehittämiseen ja autoimmuunisairauksien muodostumisen, sekä malignisoitumisen mekanismien selvittämiseen. Lopullinen tavoite Lichen planuksen tutkimiselle on kuitenkin sairauden muodostumisen mekanismien selvittäminen.

3 Materiaali ja menetelmät

Histopatologisia näytteitä kerättiin potilaista, jotka ovat käyneet Suu- ja leukasairauksien osastolla Helsingin yliopistollisessa sairaalassa, tai Helsingin Yliopistollisella hammasklinikalla vuosina 2007 – 2011. Tutkimukseen valittiin 90 henkilön joukko, joista 30 potilaalla oli OSCC, 30 potilaalla OLD, ja 30 potilasta oli terveitä kontrolliryhmässä. Tutkimuksen yhteydessä OLD potilaiden sairautta tutkittiin histologisin menetelmin, ja ryhmästä 24 todettiin sairastavan oral lichen planusta (n=10), ja muut koeryhmästä sairastivat OLR tai OLL (n=14).

OLD potilailla limakalvon oireet ilmenivät posken limakalvolla (n=17) ja kielessä (n=7). Maligniteettiryhmän potilailla oli OSCC havaittu ikenissä (n=10), kielessä (n=9), suun pohjassa (n=5), suulaessa (n=3), bukkaalisulkuksessa (n=2), sekä tonsillassa (n=1).

Potilaille teetettiin kyselykaavake WHO AUDIT:n (World health organization alcohol use disorders identification test) pohjalta, sisältäen kysymyksiä tupakoinnista ja alkoholin käytöstä. Potilaat, jotka kertoivat tupakoivansa säännöllisesti, merkattiin tutkimuksessa tupakoitsijoiksi. Potilaat kertoivat itse alkoholin kulutuksen ja tupakoinnin määrästä. Terve kontrolliryhmä sisälsi 30 yleistervettä potilasta, joista saatiin kudospäätteet viisaudenhampaan poiston yhteydessä. Tutkimukseen osallistuneet kontrolliryhmässä olevat tutkittiin suuontelon limakalvolesioiden varalta ennen biopsian ottoa.

OLD-potilaiden näytteet otettiin leesion kohdasta limakalvolta. Koepalat sisälsivät epiteeliä ja stroomakudosta. Näytteet säilytettiin 10% puskuroidussa formaliinissa parafiiniin pakattuna. Kontrolliryhmän koepalat otettiin heti viisaudenhampaan poiston jälkeen bukkaaliselta limakalvolta inkiisiokohdasta.

60 näytettä valmistettiin histopatologista diagnoosia ja immunohistokemiallista analyysia varten. Koepalat olivat paksuudeltaan 4 mikrometriä ja ne asetettiin lasilevyille. Tämän jälkeen leikkeet deparafinisoitiin xyleenillä ja rehydroitiin etanolilla. Leikkeet inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä pepsiinissä, jotta antigeenit saatiin paljastettua säilönnän jälkeen. Kudoksen sisäinen peroksidaasiaktiivisuus hiljennettiin leikkeessä inkuboimalla vetyperoksidaasia metanoliiin.

Kontrolli-inkuboinnit suoritettiin korvaamalla primääriset vasta-aineet erityisellä puskurilla.

Jokaisesta koepalasta värjättiin leikkeet PAS-värjäyksellä (periodic acid-Schiff), jotta saatiin selville näytteissä mahdollisesti olevat Candida-sienet. TLR:t saatiin visualisoitua avidiini-biotiini-peroksidaasikompleksi -metodilla.

Immunohistokemiallinen vaihe suoritettiin analysoimalla leikkeitä valomikroskoopilla (Nikon Eclipse 80i). Pisteytykset annettiin semi-kvantitatiivisesti ja kuvattiin mikroskooppiin liitetyllä kameralla (Nikon DS-Fi1). Näytteet analysoitiin ja pisteytettiin neljän tutkijan toimesta (Peter Rusanen, Jaana Hagström, Emilia Marttila ja Tuula Salo) itsenäisesti toisista riippumatta. Pisteytykset annettiin neljästä vaihtoehdosta: 0 = ei värjäytymistä, 1 = värjäytyminen 1-33% soluista, 2 = värjäytyminen 34-66% soluista, 3 = värjäytyminen 67-100% soluista.

Tutkimus hyväksyttiin Helsingin yliopistollisen sairaalan eettisen lautakunnan toimesta. Koehenkilöt allekirjoittivat hyväksynnän tutkimukselle. Tuloksia pidettiin tilastollisesti merkittävänä p-arvon ollessa alle 0,05.

4 Tulokset

TLR1-aktiivisuus oli selvästi kohonnut premaligneissa leikkeissä. Kontrollinäytteissä ja maligneissa koeryhmissä TLR1-aktiivisuus oli hyvin pientä.

TLR2 ei lainkaan aktiivisuutta endoteelissä.

TLR3-aktiivisuus oli kohonnut premalignin koeryhmän leikkeissä, voimakkuusero oli pienempi kuin TLR2 ja voimakkuuseroa voidaan pitää merkittävänä. Terveessä koeryhmässä TLR3-aktiivisuus oli suurempi, kuin OSCC diagnoosin saaneilla.

TLR4 oli tutkimuksen ainoa, jolla endoteelikerroksen soluissa oli kontrolliryhmässä suurempi aktiivisuus kuin OLP:ta sairastavien koeryhmässä. Maligneja muutoksia omaavilla potilailla TLR4-tasot olivat merkittävästi pienempiä molempiin muihin ryhmiin verrattuna.

TLR5-aktiivisuudet olivat vähäiset, mutta muutamissa premaligneissa näytteissä oli aktiivisuutta. OSCC-potilailla oli vielä pienempi aktiivisuus.

TLR6-aktiivisuus oli tutkimuksen reseptorityypeistä toiseksi korkein premalignissa ryhmässä. Aktiivisuus oli matalampi OSCC-potilaiden ryhmässä.

Kontrolliryhmässä havaittiin melko korkea TLR7-aktiviteetti, joka oli korkeampi premalignissa koeryhmässä, ja matalampi OSCC-potilailla. TLR7-aktiviteetti oli tutkimuksen reseptorityypeistä korkein premalignissa ryhmässä.

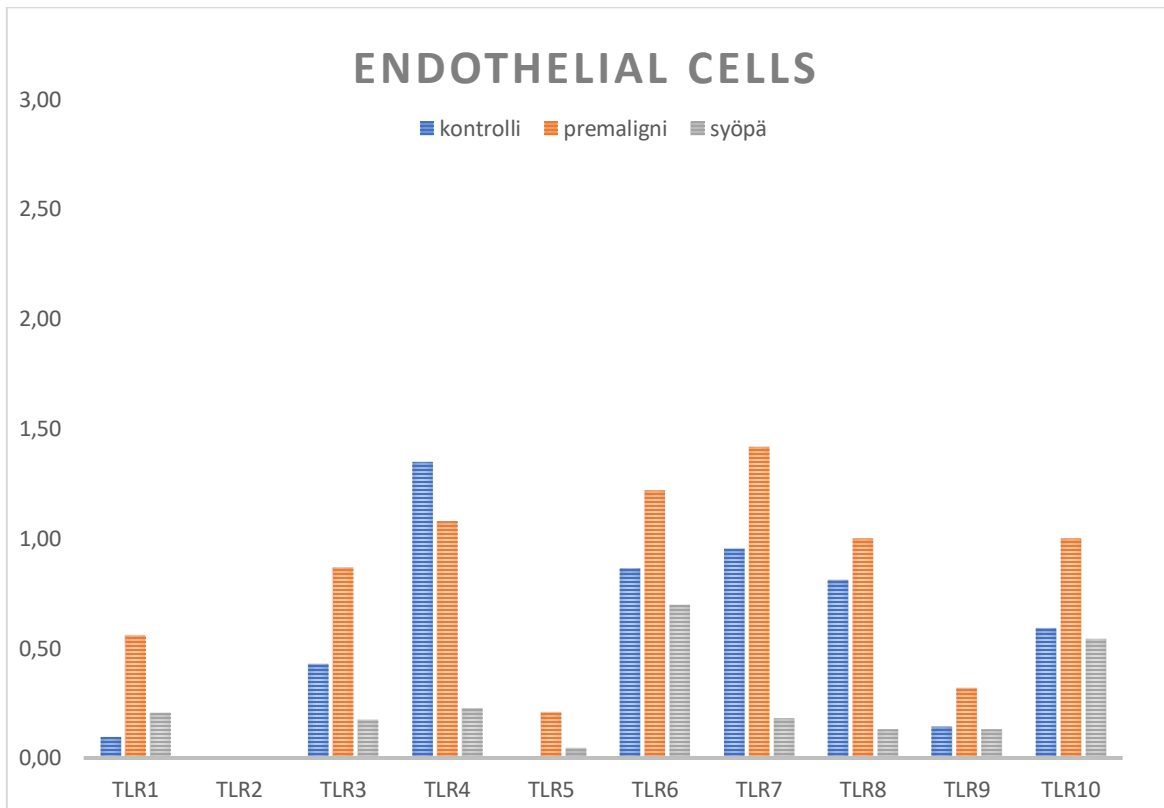
TLR8-aktiivisuuden muutokset vastasivat TLR7:ää, mutta kontrolliryhmän ja OLP:ta sairastavilla aktiivisuusero oli pienempi.

TLR9-aktiivisuus on tutkimustulosten perusteella suurentunut OLP:ta sairastavilla kontrolliin verrattuna.

TLR10 aktiivisuus oli samalla tasolla kontrolliryhmän ja OSCC-potilaiden kanssa, mutta selvästi kohonnut premalignien muutosten koeryhmässä.

Kun verrataan premalignia koeryhmää ja maligneja muutoksia omaavaa ryhmää, voidaan todeta TLR6 ja TLR10 erottuvan joukosta. Muiden reseptorien toiminta on merkittävästi matalampi syöpämuutoksia omaavissa kudoksenäytteissä, mutta edellä mainituissa reseptoreissa aktiivisuus oli suurempi kuin muilla ryhmillä.

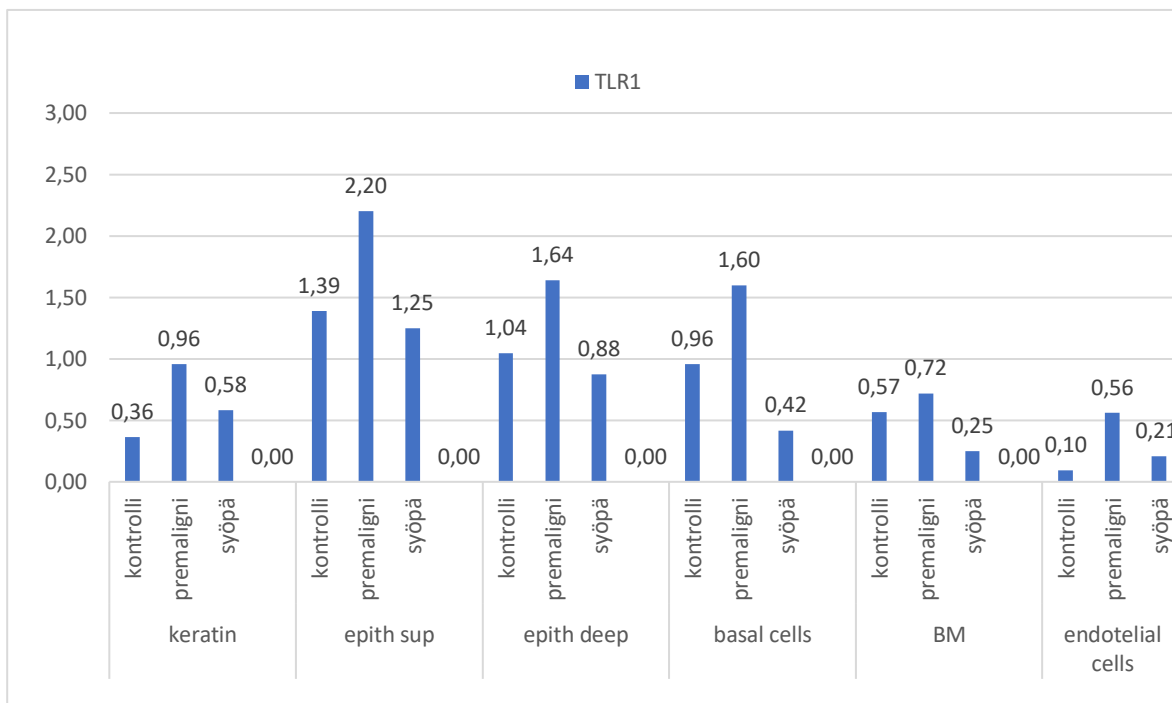
Reseptorien aktiivisuus oli suurin premalignissa koeryhmässä TLR4 lukuunottamatta.



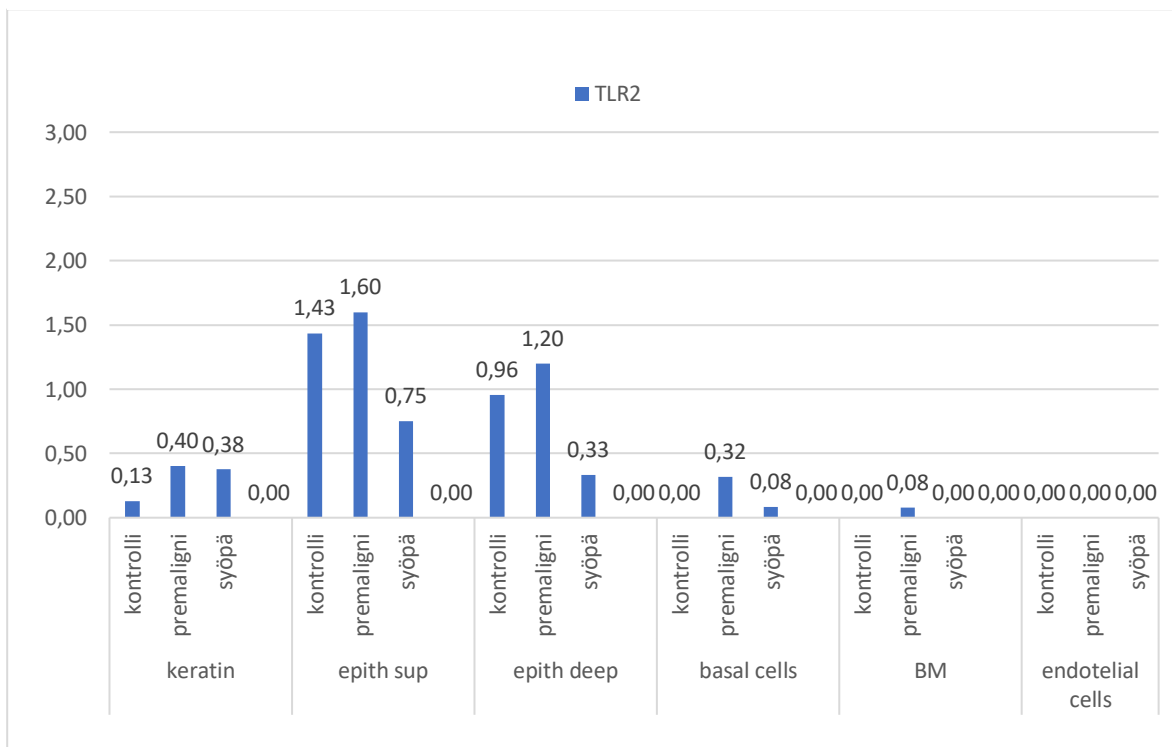
Kuva 1

Yllä olevasta diagrammitaulukosta nähdään endoteelisolukon värjäytymisasteen perusteella määritetty reseptorityypin aktiivisuustaso eri koeryhmissä.

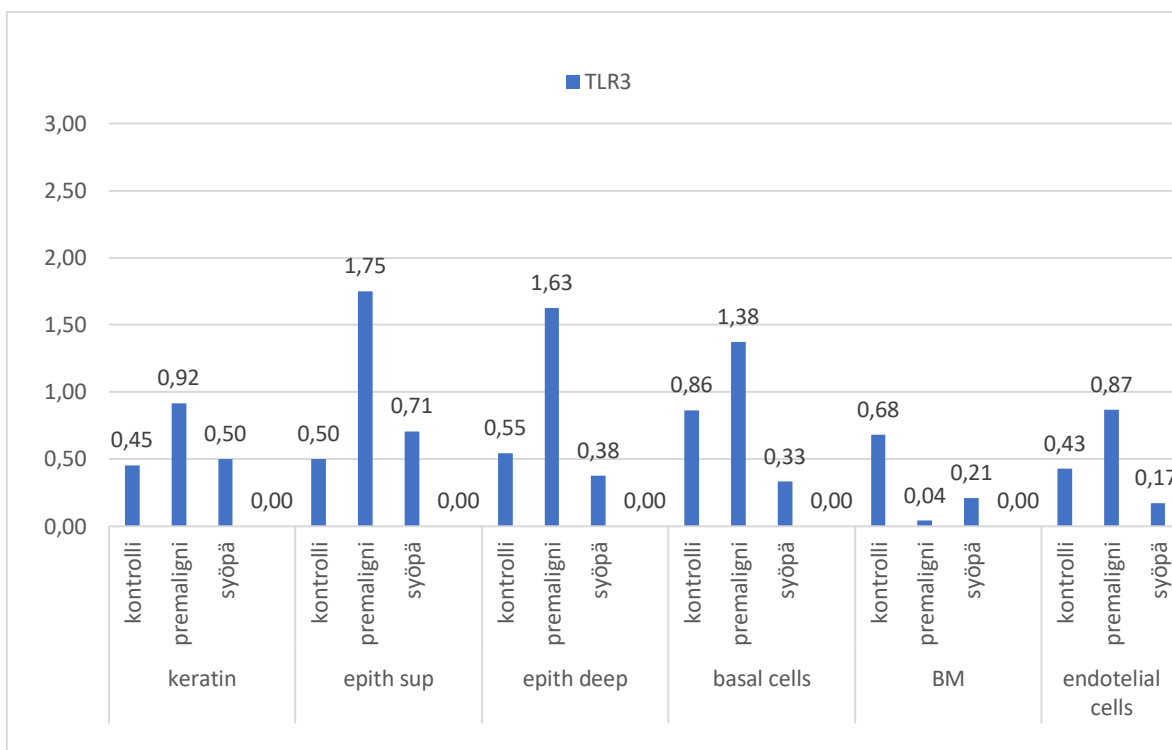
Alempana kuvissa on näkyvissä TLR1-10 reseptorien aktiivisuudet erikseen jokaisessa solukerroksessa.



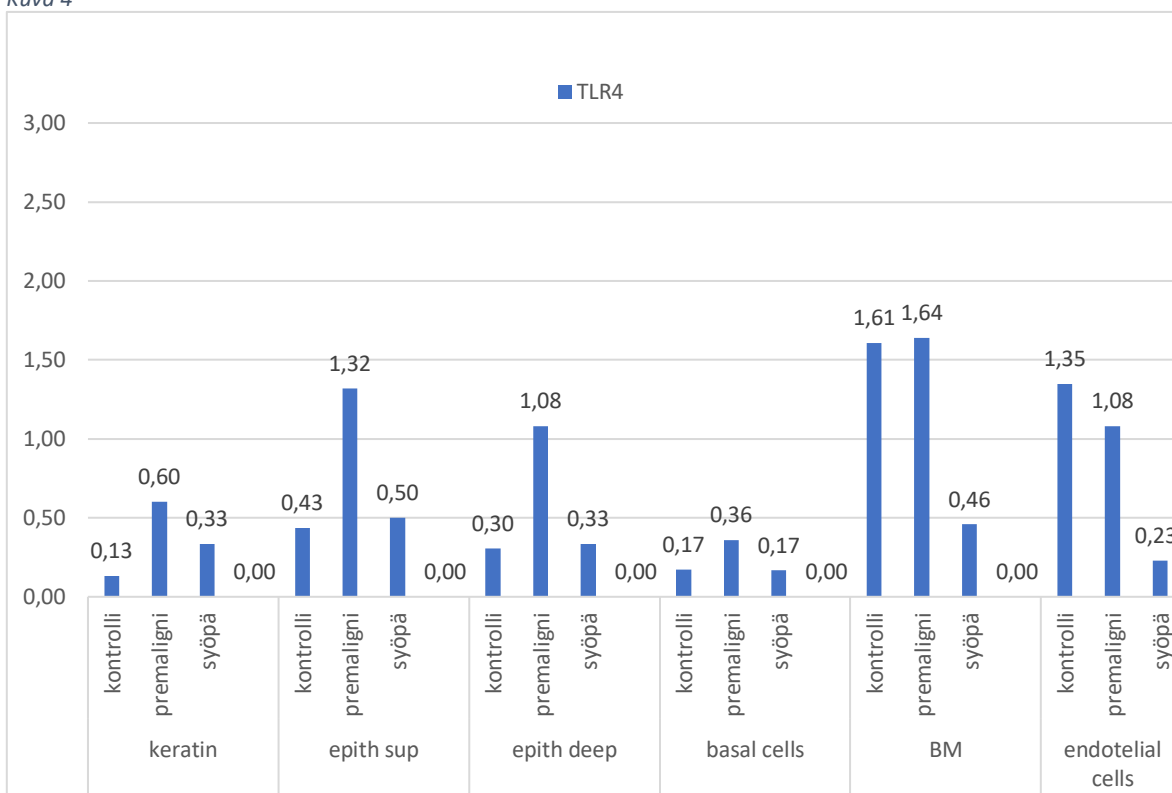
Kuva 2



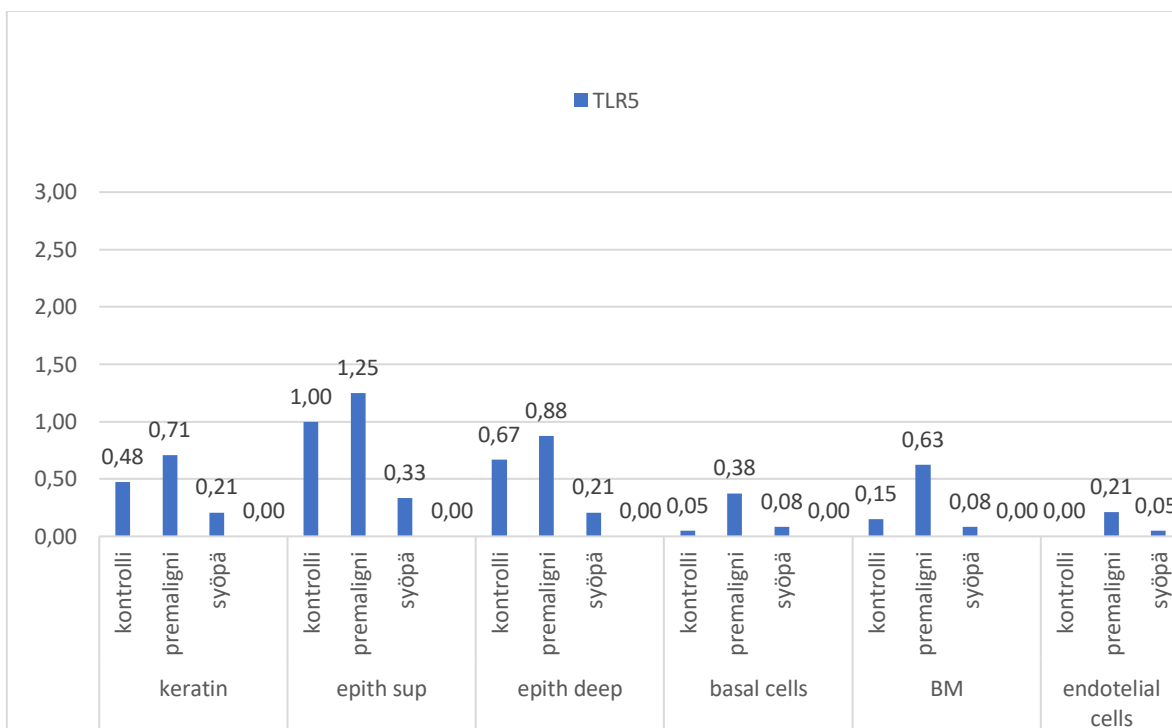
Kuva 3



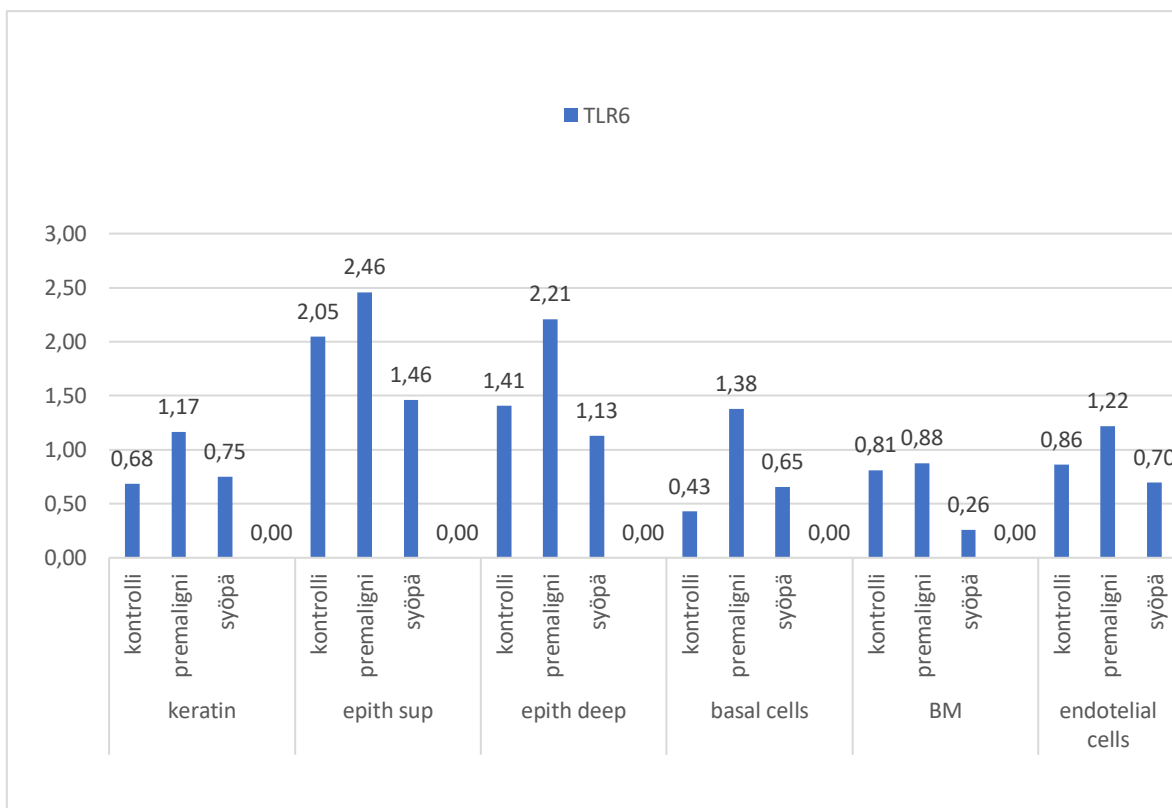
Kuva 4



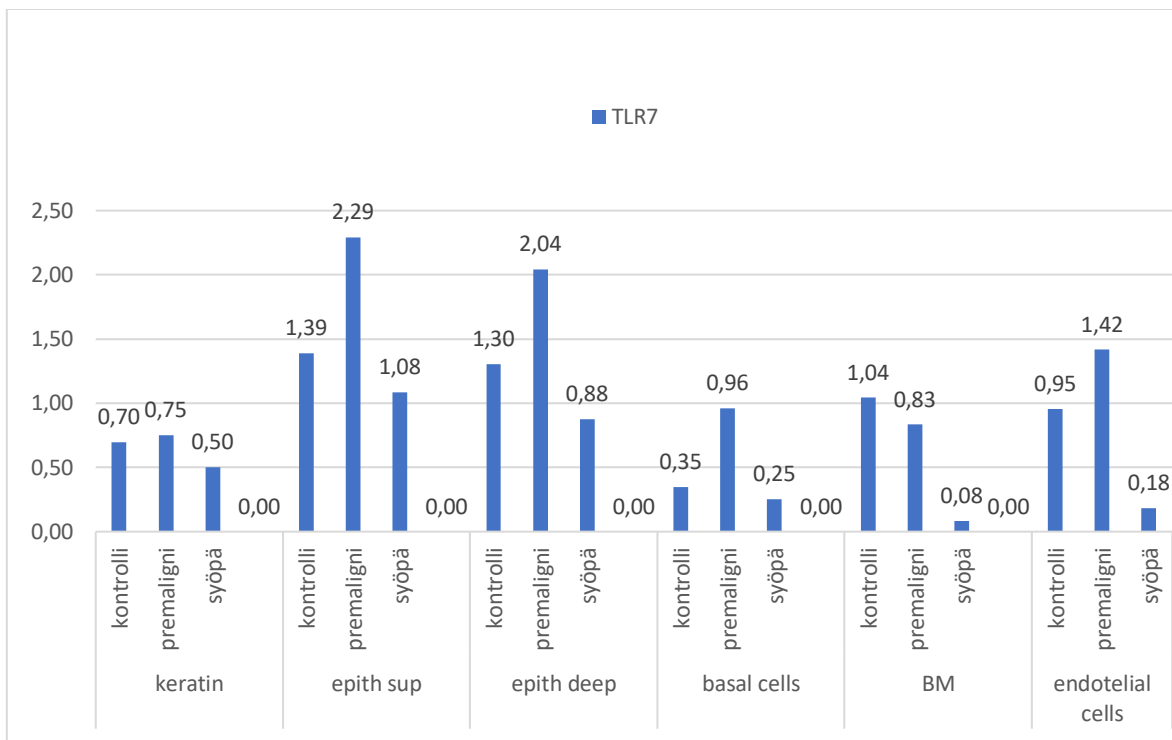
Kuva 5



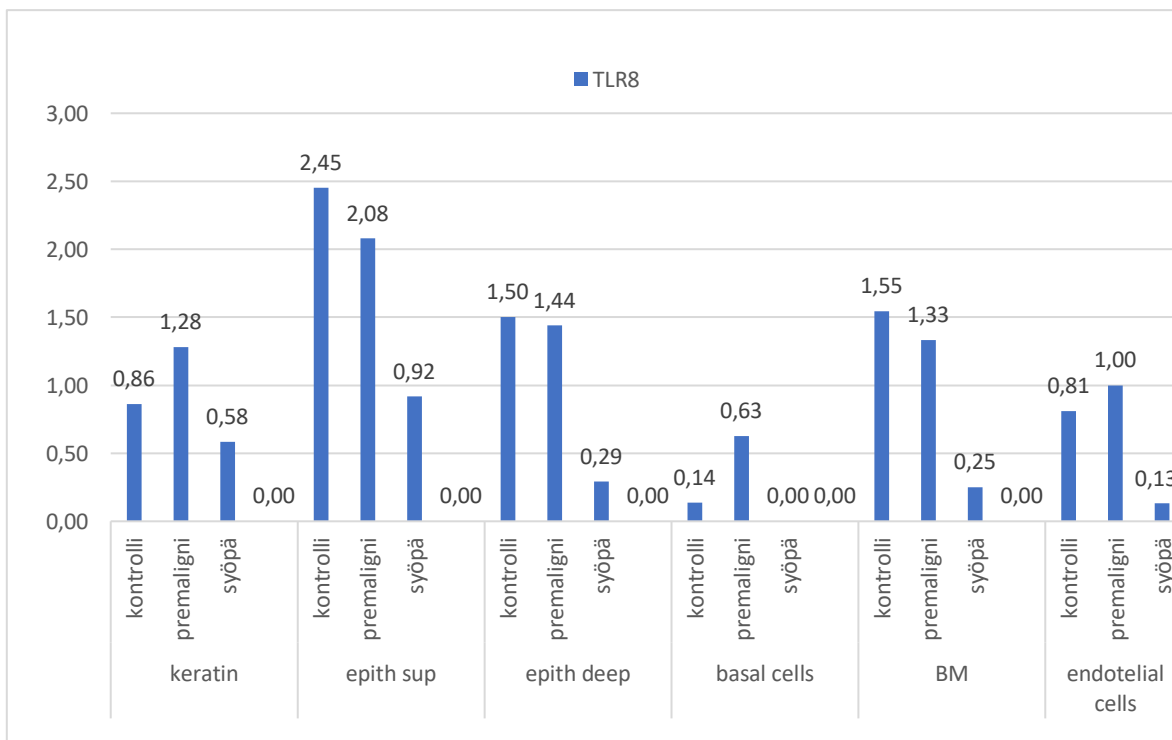
Kuva 6



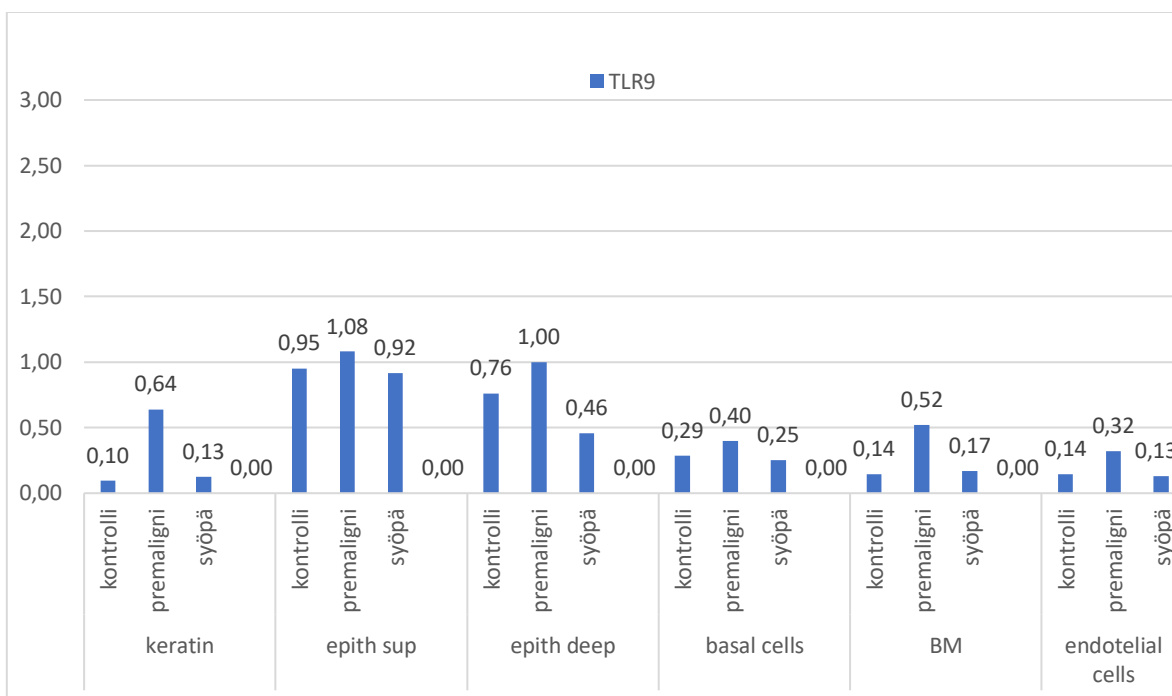
Kuva 7



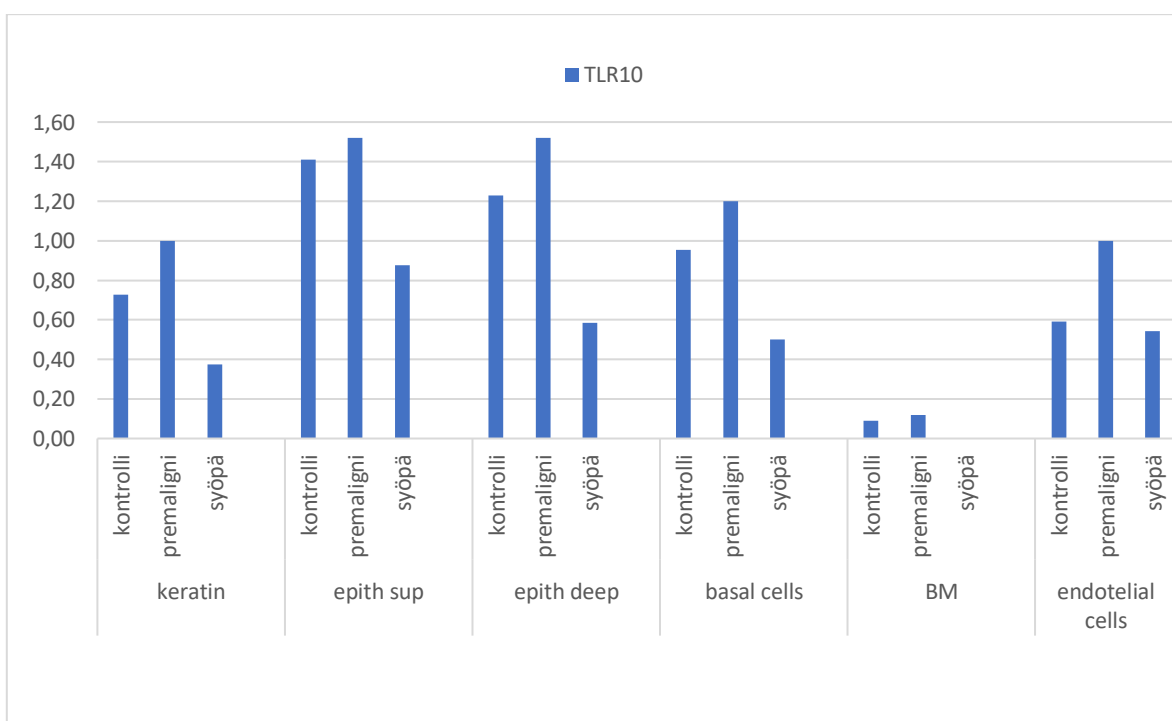
Kuva 8



Kuva 9



Kuva 10



Kuva 11

5 Johtopäätökset

Tutkimuksessa yhdenkään koeryhmän kudospäätteistä ei saatu värjättyä missään kudoserroksessa TLR2:a. Erityisesti TLR2:n ilmentymisen puutetta endoteelikerroksessa selittää Faure et al. (34) tutkimuksessa todettu ihmisen dermoksen mikrovaskulaarisissa endoteelisoluissa (HMEC) edellä mainitun reseptorin puuttuminen tai merkittävä inaktiivisuus, mutta sen sijaan TLR4-reseptorin suuri aktiivisuus on havaittu samassa tutkimuksessa. Vaikka TLR2:a ei saatu värjättyä kudospäätteissä, löytyi terveestä kontrolliryhmästä TLR1 -aktiivisuutta. TLR1 ja 2, sekä TLR2 ja 6 muodostavat dimeerirakenteen (6). Onkin siis todennäköistä että TLR2 löytyy endoteelikerroksesta, mutta sen aktiivisuus on merkittävästi alentunut. Tämän inaktiivisuuden syytä tulisi tutkia lisää jatkossa.

TLR4 ja TLR9 on muissa tutkimuksissa todettu olleen runsaammin edustettuna suun limakalvojen lichen planus -infektioissa terveisiin kontrolleihin verrattuna: TLR9 on pinnallisessa epiteelikerroksessa, ja TLR4 basaalikerroksessa vahvimmillaan. TLR4 on Zhang et al. (35) tutkimuksessa päätelty mahdollisesti vaikuttavan OLP:n syntymiseen erityisesti basaalikerroksessa mekanismilla, jolla TLR4-stimuloidut keratinosyytit inhiboivat OLP CD4+ ja OLP CD8+ T-solujen proliferaatiota, ja samalla vauhdittivat niiden apoptoosia.

Park et al. (9) tutkimuksessa tutkittiin TLR2-5, sekä TLR7 ja TLR9 vaikutusta YD-10B -solujen OSCC:n kehitykseen. TLR2 ja 5 eivät edesauttaneet OSCC:n kehitystä, mutta kyseisestä solulinjasta ei löytynyt lainkaan TLR4:n ilmentymistä. Tässä tutkimuksessa TLR4 aktiivisuus oli OSCC-potilailla keskiarvoltaan melko matalalla tasolla: 0,23 asteikolla 0-3. Ryhmän koehenkilöistä vain 3 henkilöllä oli TLR4-aktiivisuutta.

TLR9-aktiivisuuden lisääntyminen on yhdistetty preneoplastisiin ja neoplastisiin muutoksiin, joilla voi olla suurentunut merkitys malignisoitumisen kannalta. TLR9 havaitsee mitokondriaalista DNA:ta, merkiten kudostuhoa. Tunnistuksen tapahtuessa paikallisesti ajaututaan epiteliaaliseen dysfunkiotilaan, joka vuorostaan aiheuttaa tulehdusreaktion. TLR9 on tyypillinen hahmontunnistusreseptori, joka havaitaan osallisena autoimmuuniperäisissä sairauksissa (10, 36). Tässä tutkimuksessa endoteelisoluissa nähdään vain lievä TLR9-aktiivisuuden lisäys premalignissa koeryhmässä kontrolliin verrattuna.

TLR10 on uusin löydetty TLR-ryhmän reseptori. Tiedetään, että tämä nimenomainen reseptori aiheuttaa anti-inflammatorisen reaktion ja toimii koreseptorina yhdessä TLR2:n kanssa, kuten myös TLR1 ja 6. TLR10-reseptorista ei ole toistaiseksi kovin kattavaa tietoa, vaikka muutama sen ligandeista onkin tunnistettu (37).

TLR-vaste aktivoi, kuten edellä on mainittu NF-KB aktivaatiota tukien tuumorin muodostusta tulehduksellisessa syövän kehityksessä (9). Tämän mekanismin takana on NF-KB:n aktivaation jälkeen erittyvät sytokiinit IL6 ja IL1, erilaisia antiapoptoottisia yhdisteitä (Bcl-XL, ABL) sekä aiemmin mainittu VEGF, joka on proangiogeneettinen faktori (38).

6 Pohdinta

Suun punajäkälä on autoimmuunisairaus, jonka oireina ovat limakalvojen muutokset sairauden muodosta riippuen, kipu, sekä ruoka-aineherkkyys. Sairauden syy on tuntematon, eikä sen riskitekijöitä tiedetä. OLP:tä sairastaa noin 3% väestöstä.

OLP:n on havaittu olevan yhteydessä kohonneeseen suusyöpäriskiin, ja tiedetään myös että sairauden muodolla on vaikutusta riskin suuruuteen sekä OLP:n sijainnilla suussa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää korrelaatiota TLR1-10 aktiivisuuksilla maligniteetteihin sekä premaligneihin muutoksiin, eli OLP:een

Tässä tutkimuksessa havaittiin selkeä yhteys TLR 6 ja 10 -reseptoreiden aktiivisuuden ja suun limakalvomaligniteettien välillä. Havaittiin myös, että TLR1-10 aktiivisuus TLR4 lukuunottamatta oli korkein premalignissa koeryhmässä. Tutkimuksen melko suppea koehenkilömäärä rajoittaa kattavien johtopäätösten luomista tutkimustuloksista.

Muutamissa kudosleikkeissä ei ollut lainkaan endoteelisolukkoa mukana, ja osa näytteistä oli leikkautunut tangentiaalisesti rajaten tutkimusmateriaalia entisestään.

Tutkimusmateriaalia oltiin kerätty kuitenkin kattavasti suppeasta koehenkilömäärästä.

Tässä tutkimusasetelmassa ei kuitenkaan hyödynnetty muuta kerättyä dataa, kuin TLR-reseptoreiden aktiivisuutta endoteelikerroksessa.

TLR10-reseptorin vaikutusta on vaikeaa arvioida, sillä se on melko hiljattain löydetty eikä kyseisestä reseptorista ole tehty vielä montaa kattavaa tutkimusta. Aikaisemmissa tutkimuksissa tälle reseptorille on kuitenkin ehdotettu ligandeja, sekä mekanismeja jotka saavat aikaan anti-inflammatorisen vaikutuksen (39). TLR10-reseptorin toimintaa syöpäsairauksissa tulisikin tutkia lisää, jotta sen vaikutuksia voidaan ymmärtää jatkossa paremmin. OLP:ta sekä TLR-reseptoreita ollaan tutkittu viimevuosien aikana varsin kattavasti. Materiaalia löytyy monista erilaisista tutkimuksista, ja siten johtopäätöksiä voidaan asettaa erilaisten tulosten pohjalta. Mielenkiintoista on toll-like reseptorien vaikutusten laaja skaala ja siten eri tutkimuskohteiden kirjo, joista OLP on vain yksi esimerkki.

7 Lähteet

1. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004;40(12):845-59.
2. Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*. 2016;148(2):125-39.
3. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
5. Salem A, Mustafa R, Listyarifah D, Al-Samadi A, Barreto G, Nordström D, et al. Altered Expression of Toll-like Receptors in Human Oral Epithelium in Oral Lichenoid Reactions. *Am J Dermatopathol*. 2017;39(11):811-8.
6. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
7. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2).
8. Rutkowski MR, Stephen TL, Svoronos N, Allegrezza MJ, Tesone AJ, Perales-Puchalt A, et al. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell*. 2015;27(1):27-40.
9. Park JH, Yoon HE, Jeon DI, Ahn SG, Yoon JH. Activation of TLR2 and TLR5 did not affect tumor progression of an oral squamous cell carcinoma, YD-10B cells. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(10):781-5.
10. Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, et al. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect Immun*. 2008;76(5):2123-9.
11. Mäkinen LK, Ahmed A, Hagström J, Lehtonen S, Mäkitie AA, Salo T, et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 in primary, metastasized, and recurrent oral tongue squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(5):338-45.
12. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*. 2018;59:391-412.
13. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(4):495-505.
14. Rusanen P, Marttila E, Uittamo J, Hagström J, Salo T, Rautemaa-Richardson R. TLR1-10, NF- κ B and p53 expression is increased in oral lichenoid disease. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181361.
15. Salvador B, Arranz A, Francisco S, Córdoba L, Punzón C, Llamas M, et al. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacol Res*. 2016;108:46-56.
16. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
17. Alrashdan MS, Cirillo N, McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(8):539-51.
18. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci*. 2007;49(2):89-106.
19. Quispel R, van Boxel OS, Schipper ME, Sigurdsson V, Canninga-van Dijk MR, Kerckhoffs A, et al. High prevalence of esophageal involvement in lichen planus: a study using magnification chromoendoscopy. *Endoscopy*. 2009;41(3):187-93.
20. Thongprasom K, Carrozzo M, Furness S, Lodi G. Interventions for treating oral lichen planus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011(7):Cd001168.
21. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(1):15-21.

22. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28(1):100-8.
23. Laeijendecker R, Van Joost T, Tank B, Oranje AP, Neumann HA. Oral lichen planus in childhood. *Pediatr Dermatol.* 2005;22(4):299-304.
24. Mignogna MD, Lo Muzio L, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Bucci E. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. *Oral Oncol.* 2001;37(3):262-7.
25. Janardhanam SB, Prakasam S, Swaminathan VT, Kodumudi KN, Zunt SL, Srinivasan M. Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol.* 2012;57(5):495-502.
26. Aghbari SMH, Abushouk AI, Attia A, Elmaraezy A, Menshawy A, Ahmed MS, et al. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.* 2017;68:92-102.
27. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(3):328-34.
28. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
29. Ruokonen HMA, Juurikivi A, Kauppila T, Heikkinen AM, Seppänen-Kaijansinkko R. High percentage of oral lichen planus and lichenoid lesion in oral squamous cell carcinomas. *Acta Odontol Scand.* 2017;75(6):442-5.
30. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence.* 2015;6(3):244-8.
31. Caldeira PC, Soto AML, de Aguiar MCF, Martins CC. Tumor depth of invasion and prognosis of early-stage oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Oral Dis.* 2020;26(7):1357-65.
32. Ho AS, Kraus DH, Ganly I, Lee NY, Shah JP, Morris LG. Decision making in the management of recurrent head and neck cancer. *Head Neck.* 2014;36(1):144-51.
33. Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
34. Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(15):11058-63.
35. Zhang J, Tan YQ, Wei MH, Ye XJ, Chen GY, Lu R, et al. TLR4-induced B7-H1 on keratinocytes negatively regulates CD4(+) T cells and CD8(+) T cells responses in oral lichen planus. *Exp Dermatol.* 2017;26(5):409-15.
36. Siponen M, Kauppila JH, Soini Y, Salo T. TLR4 and TLR9 are induced in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(10):741-7.
37. Fore F, Indriputri C, Mamutse J, Nugraha J. TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Netw.* 2020;20(3):e21.
38. Boufraqech M, Fassassi C, Kebebew E. TLR-10 polymorphism and papillary thyroid cancer: one more SNP to consider? *Endocrine.* 2013;43(1):10-1.
39. Su SB, Tao L, Deng ZP, Chen W, Qin SY, Jiang HX. TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scand J Immunol.* 2021;93(4):e12988.